

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036560**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.23

(51) Int. Cl. **A61K 39/39** (2006.01)
C01B 25/36 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890430

(22) Дата подачи заявки
2016.06.13

(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГЕЛЯ ФОСФАТА АЛЮМИНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТАХ

(31) **2963/CHE/2015**

(32) **2015.06.12**

(33) **IN**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/IN2016/000151**

(87) **WO 2016/199162 2016.12.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОЛОДЖИКАЛ И ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
**Рави Ганапатхи, Нагиредди Гаде,
Маниш Манохар, Викрам Мадхусадан
Парадкар, Махима Датла (IN)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) BURRELL L.S. ET AL.: "Aluminium phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part I: composition and structure", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 19, no. 2-3, 15 September 2000 (2000-09-15), pages 275-281, XP027321946, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2000-09-15], cited in the application, page 276, column 1, paragraph 2; table 1

BURRELL L.S. ET AL.: "Aluminium phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part II: physicochemical properties", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 19, no. 2-3, 15 September 2000 (2000-09-15), pages 282-287, XP027321947, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2000-09-15], cited in the application, figure 4
WO-A1-2013078102

(57) Изобретение относится к усовершенствованному способу получения геля фосфата алюминия (AlPhos, алюминийфосфатного геля), в котором растворы соли алюминия и соли в виде щелочного фосфата добавляют к воде, поддерживая рН, при перемешивании с получением осадка, с последующей стерилизацией указанного осадка и в конечном счете получением алюминийфосфатного геля.

B1

036560

036560 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к усовершенствованному способу получения геля фосфата алюминия (AlPhos, алюминийфосфатного геля). Он также относится к применению алюминийфосфатного геля, в особенности в иммуногенных и/или вакцинных композициях, для адсорбции антигена(ов).

Предпосылки создания изобретения

Вакцинная композиция может содержать один или более адьювантов. "Адьюванты" представляют собой вещества, которые включаются или вводятся одновременно с антигеном и которые неспецифически усиливают последующие иммунные ответы. Полученные иммунные ответы длятся дольше, поддерживая достаточные уровни антител, в подвергнутой введению популяции. По практическим и экономическим причинам этой профилактической иммунизации необходимо достичь с помощью минимального числа введений и с использованием минимального количества антигена, совместимого с эффективной иммунизацией. Природа этих адьювантов может быть неорганической, как квасцы, такие как фосфат алюминия и гидроксид алюминия, которые чаще всего используются в вакцинах для людей, и органической, как сквален.

В ветеринарных вакцинах обычно используются масляные адьюванты. Вакцина, используемая для профилактики гриппа, вызываемого вирусом H5N1, который обычно именуют "птичьим гриппом", содержит адьювант AS03, эмульсию типа масло-в-воде. Адьювант AS03 состоит из масляных соединений D,L-альфа-токоферола (витамина E), сквалена, эмульгатора полисорбата-80, который помогает ингредиентам смешиваться и не дает им разъединяться, и воды, содержащей небольшие количества солей.

Соли алюминия широко используются с 1930-х годов. Единственными адьювантами, разрешенными Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств для применения в вакцинах для людей, являются содержащие алюминий адьюванты благодаря их долгой истории безопасного и эффективного применения. Glenny et al. описали эффект соединений алюминия в качестве адьюванта (Glenny A.T., Pope C.G. Waddington H., Wallace U. Immunological Notes XVII to XXIV J. Pathol., 29, 31-40, 1926).

Несмотря на это, содержащие алюминий адьюванты были описаны как трудные для производства с воспроизводимыми физико-химическими свойствами. Scholtz et al., в 1984 году получили чистый фосфат алюминия, используя эквивалентные количества хлорида алюминия и тринатрийфосфата.

Алюминийфосфатный гель используют в препаратах жидкой пятивалентной вакцины (LPV) в качестве "адьюванта", помогающего усилить иммуногенные ответы на поверхностный антиген вируса гепатита-B, дифтерийный и столбнячные анатоксины, которые адсорбированы на частицах геля, а также, возможно, на цельноклеточные коклюшные антигены. Соли алюминия используются в вакцинах DTaP, противопневмококковой конъюгатной вакцине и вакцинах против гепатита В. Несмотря на поиск альтернативных адьювантов, соединения алюминия (фосфат и гидроксид алюминия) будут по-прежнему использоваться в качестве адьювантов для вакцин для людей в течение многих лет из-за их хорошей репутации, заключающейся в безопасности, низкой стоимости и адьювантности с рядом антигенов.

Два способа широко используются для приготовления вакцин и анатоксинов с соединениями алюминия - *in situ* осаждение соединений алюминия в присутствии антигена (первоначально разработанное для очистки анатоксинов путем осаждения квасцами) и адсорбция антигена на предварительно образованном алюминиевом геле. Адсорбция антигенов на содержащих алюминий адьювантах либо во время *in situ* осаждения содержащих алюминий адьювантов, либо на предварительно образованных алюминиевых гелях зависит от физических и химических характеристик антигена, типа содержащего алюминий адьюванта и условий адсорбции. Эти условия часто упускаются из виду, и плохо приготовленный препарат содержащего алюминий адьюванта не проявляет оптимальной адьювантности.

В SU 481539 описывается способ получения пористого гидрогеля алюмофосфата с помощью реакции хлорида алюминия с 85% фосфорной кислотой. Полученный раствор охлаждали до температуры от -8 до -10°C, медленно вводили при энергичном перемешивании, охлаждали до той же температуры, что и окись этилена. Полученный гель нагревали при температуре 50-350°C и давлении водяного пара 1-170 атм в течение 2 ч, промывали дистиллированной водой, сушили и прокаливали при 200°C на воздухе при 650-700°C в течение 4-6 ч.

В SU 550340 описывается способ получения алюминийфосфатного геля с помощью реакции ацетата алюминия с фосфорной кислотой с последующей фильтрацией, промывкой, сушкой при 30-40°C в течение 12 ч, затем при 110-120°C в течение 4 ч и активацией продукта при 600°C в течение 4 ч. Предлагаемый способ также является сложным и трудоемким, поскольку в его случае требуется длительное время высушивания и активация конечного продукта при высоких температурах.

В SU 559895 описывается способ получения аморфного гидрата фосфата алюминия с помощью реакции раствора нитрата алюминия и фосфорной кислоты в молярном соотношении 1:0,95-1,05 с последующей нейтрализацией аммиаком до pH 6 с температурой в диапазоне 15-20°C. Полученный продукт фильтруют, промывают водой и сушат при температуре 60-80°C.

В DE 2152228 описывается способ получения алюминийфосфатного геля, который включает образование смеси алюмината натрия, фосфорной кислоты и сульфата алюминия в водной среде, реакцию в смеси таким образом, чтобы значение pH полученной суспензии находилось между 5 и 6, и нагревание

осаждаемого фосфата алюминия до температуры выше 70°C во время или после его осаждения.

В RU 2149138С описывается способ получения алюминийфосфатного геля, в котором исходный раствор водорастворимых солей алюминия и фосфорнокислого натрия подвергали фильтрации на установке для микрофильтрации с порогом пропускания 0,22 мкм и осуществляли реакцию растворимой соли алюминия с фосфатом натрия. Желаемый продукт осаждали при энергичном перемешивании в течение 15-45 мин при скорости вращения мешалки 3,3-8,3 с⁻¹. Алюминийфосфатный гель образуется при температуре 18-60°C в течение 5-7 дней, а затем его промывают.

В WO 2009/136233 А1 описывается способ получения наночастиц фосфата алюминия с диаметром частиц менее 1000 нм, предпочтительно от 10 до 600 нм, включающий а) приготовление алюминийфосфатного геля; б) регулирование рН алюминийфосфатного геля; в) подвергание алюминийфосфатного геля уменьшению размера; г) получение наночастиц фосфата алюминия желаемого размера и е) необязательно, суспендирование наночастиц в подходящем буфере, причем алюминийфосфатный гель может быть получен (i) *in situ*, (ii) суспендированием порошка фосфата алюминия в подходящем растворителе или (iii) обработкой эквивалентного количества хлорида алюминия тринатрийфосфатом для осуществления образования алюминийфосфатного геля с последующим удалением хлорида, если требуется.

В патенте США № 8540955 описывается усовершенствованный способ получения содержащего алюминий адьюванта AlPO₄, который включает стадии смешивания раствора хлорида алюминия и раствора трехосновного фосфата натрия с получением осадка фосфата алюминия, причем усовершенствование включает осаждение осадка фосфата алюминия при температуре в диапазоне от приблизительно 50 до приблизительно 70°C.

Burtell et al. [Vaccine. 1999 Jun 4; 17 (20-21):2599-603] обнаружили, что адьювант в виде фосфата алюминия оставался аморфным после автоклавирования в течение 30 или 60 мин при 121°C. Однако происходили реакции депротонирования и дегидратации, о чем свидетельствует уменьшение рН. Способность к адсорбции белков, скорость нейтрализации кислот при рН 2,5 и точка нулевого заряда также уменьшались, что указывает на то, что реакции депротонирования/дегидратации приводили к уменьшению площади поверхности.

Burfell et al. [Vaccine. 2000 Sep 15, 19(2-3):275-81] описали способ получения адьюванта в виде фосфата алюминия, в котором водный раствор, содержащий хлорид алюминия и дигидрофосфат натрия, закачивали в реакционный сосуд с постоянной скоростью. Второй насос вводил раствор гидроксида натрия со скоростью, необходимой для поддержания желаемого рН. Осаждения проводили между рН 3,0 и 7,5 с интервалами рН 0.

Характеристики содержащих алюминий адьювантов, такие как размер частиц геля, адсорбционная способность, изоэлектрическая точка и отношение алюминия к фосфату, зависят от условий образования этих гелей, в том числе порядка добавления реагентов, скорости, с которой добавляют и смешивают реагенты, скорости перемешивания, времени, необходимого для регулирования рН, и шкалы гелеобразования. По этой причине содержащие алюминий адьюванты были описаны как трудные в производстве физически-химически воспроизводимым образом, что приводит к варьированиям между партиями.

Способы приготовления алюминийфосфатного геля, описанные в вышеупомянутом известном уровне техники, являются трудоемкими и сложными. Хотя способы получения адьюванта в виде фосфата алюминия были описаны, в данной области техники остается потребность в способах, которые более эффективны в промышленном масштабе. Кроме того, желательно, чтобы характеристики адьюванта в виде фосфата алюминия, полученного любым новым способом, соответствовали свойствам адьюванта, уже присутствующего в различных продаваемых продуктах, чтобы сделать возможным его применение в вакцинных препаратах.

Цель изобретения

Основная цель настоящего изобретения заключается в обеспечении усовершенствованного процесса получения алюминийфосфатного геля простым и экономичным способом.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы избежать использования добавления щелочи или кислоты для различного регулирования рН, как ранее использовалось в уровне техники, наоборот, регулируют производственные материалы и параметры, чтобы алюминийфосфатный гель образовывался в оптимизированных условиях и концентрации; это позволит избежать использования щелочей, таких как карбонаты и гидроксиды, которые будут создавать новые виды солей и неоднородную структуру геля, поэтому может потребоваться их удаление.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы иметь способ, который является простым, легким в управлении, быстрее выполнимым и который позволяет избежать экстремальных температур или длительных периодов для образования и т.д.

Конечная цель настоящего изобретения заключается в демонстрации пригодности алюминийфосфатного геля, приготовленного, как описано, в вакцинных препаратах в качестве адьюванта.

Короче говоря, настоящее изобретение относится к усовершенствованному, масштабируемому способу получения стерильного алюминийфосфатного геля с хорошей эффективностью, но с сокращением времени, усилий и затрат с демонстрацией его пригодности при изготовлении стабильных вакцинных препаратов.

Краткое описание сущности настоящего изобретения

Настоящим изобретением обеспечивается усовершенствованный способ приготовления алюминий-фосфатного геля, который включает:

- i) добавление растворов соли алюминия и соли в виде щелочного фосфата к воде, поддерживая pH между 3,0 и 4,0, при перемешивании с получением осадка;
- ii) стерилизацию осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120-150°C в течение периода времени от 30 до 90 мин;
- iii) получение алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся D_{50} в пределах от 3,0 до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем этот способ лишен стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и удаления супернатанта.

По существу, настоящее изобретение относится к способу получения алюминийфосфатного геля с контролируемым и единообразным распределением частиц по размеру, путем манипулирования концентрациями растворов, параметрами смешивания и скоростями добавления, но без какой-либо необходимости в стадиях определения размеров и промывки геля.

Подробное описание настоящего изобретения

Настоящим изобретением обеспечивается способ получения алюминийфосфатного геля, который включает стадии добавления соли алюминия и соли в виде щелочного фосфата к воде, поддерживая pH между 3,0 и 4,0 при перемешивании с получением осадка.

Соль алюминия, используемая в соответствии с настоящим изобретением, находится в форме гексагидрата хлорида алюминия.

Щелочной фосфат, используемый в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой фосфат натрия, предпочтительно трехосновный фосфат натрия или двухосновный фосфат натрия.

pH поддерживается добавлением определенных концентраций растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата. Предпочтительно используют концентрацию между 400 и 500 миллимоль (мМ), более предпочтительно от 480 до 490 мМ.

Как хлорид алюминия, так и тринатрийфосфат добавляют к воде при перемешивании в течение периода от 10 до 60 мин, предпочтительно от 35 до 55 мин, с добавлением исходного количества раствора хлорида алюминия в течение периода от 1 до 60 с, предпочтительно 30 с, более предпочтительно от 2 до 10 с, перед добавлением раствора фосфата натрия, для поддержания pH осадка между 3,0 и 4,0, предпочтительно между 3,2 и 3,5, почти на протяжении всей реакции, за исключением последней составляющей 5-10% части добавления.

Растворы добавляют к воде при перемешивании со скоростью не менее 400 об/мин, предпочтительно между 500 и 600 об/мин и более подходяще в пределах от среднего до более высокого.

Растворы хлорида алюминия и тринатрийфосфата добавляют к воде при комнатной температуре или при температуре от 20 до 25°C.

Растворы хлорида алюминия и тринатрийфосфата добавляют и смешивают с водой в сосуде, который имеет перегородки, минимум 2 и предпочтительно от 2 до 4 перегородок. Механизм перемешивания установлен сверху, и перемешивающий стержень имеет по крайней мере 3 лопастных колеса, каждое из которых имеет не менее 4 лопастей.

В соответствии со способом настоящего изобретения гель образуется при pH от 3,2 до 3,5 без добавления какой-либо другой кислоты или щелочи. Этот способ может использоваться для обеспечения геля с концентрацией не более 3 мг/мл алюминия, предпочтительно в области до 2,5 мг/мл алюминия.

Алюминийфосфатный гель, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением, имеет распределение частиц по размеру, в случае которого D_{90} находится в области <15 мкм, предпочтительно от 5 до 10 мкм.

Эффективность способа значительно увеличивают, добавляя хлорид алюминия и трехосновный фосфат натрия к воде в постоянном соотношении и поддерживая pH и температуру. Такой способ также делает стадии, необходимые для очистки и концентрирования конечного продукта, т.е. алюминийфосфатного геля, излишними.

В еще одном варианте осуществления способ включает стерилизацию осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры, превышающей 120°C, предпочтительно 120-150°C, в течение периода, составляющего не менее 30 мин и предпочтительно от 30 до 90 мин.

Другим усовершенствованием настоящего изобретения является выполнение стадий способа в замкнутой системе, что увеличивает гарантию стерильности конечного продукта и уменьшает потребность в проверке на стерильность. Это делает весь способ более эффективным, поскольку это уменьшает число проверок на стерильность, которые необходимо выполнить.

В еще одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ приготовления асептически в пределах 60 мин, более предпочтительно в пределах 45 мин, с использованием предварительно стерилизованной WFI (воды для инъекций) в сосуде, подвергнутых стерилизации фильтрованием химических растворов и других, связанных со способом вспомогательных средств, стерильного алюминийфосфатного геля, который может быть немедленно использован для приготовления вакцин

без какой-либо очистки, определения размеров или другой проверки.

В еще одном варианте осуществления алюминийфосфатный гель, полученный в соответствии с настоящим изобретением, более устойчив к изменениям размеров частиц и других физико-химических параметров. Кроме того, рН геля после стерилизации находится в диапазоне, более подходящем для смешивания антигенов, которые имеют изоэлектрическую точку (pI) выше 5,0 и, таким образом, не требуют регулировки рН.

В еще одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ приготовления стерильного алюминийфосфатного геля, который неожиданно помогает избежать стадий осаждения, и, таким образом, не образуется супернатант. Следовательно, весь способ завершается в пределах периода времени от 1 до 5 ч, около последнего значения, если соблюдается режим стерилизации после приготовления, что делает его простым, экономичным и в эксплуатационном отношении очень возможным.

В предпочтительном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ приготовления алюминийфосфатного геля, который включает стадии:

i) добавление растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата к воде для инъекций при перемешивании в течение 60 мин, предпочтительно от 35 до 55 мин, поддерживая рН образуемого осадка между 3,0 и 4,0, предпочтительно между 3,2 и 3,5;

ii) стерилизация осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120-150°C в течение периода времени от 30 до 90 мин;

iii) получение алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся D_{50} в пределах от 3,0 до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем этот способ лишен стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и удаления супернатанта.

Адьювант в виде фосфата алюминия, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением, оставался стабильным в течение срока годности при хранении при комнатной температуре или ниже комнатной.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ получения алюминийфосфатного геля, имеющего распределение частиц по размеру, в случае которого D_{90} находится в области <15 мкм, который включает стадии:

i) добавление растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата в концентрации от 400 до 500 мМ к воде для инъекций, причем начальное количество раствора хлорида алюминия добавляют за 2-10 с до добавления раствора фосфата натрия, при перемешивании в течение 60 мин, предпочтительно от 35 до 55 мин, поддерживая рН образуемого осадка между 3,0 и 4,0, предпочтительно между 3,2 и 3,5;

ii) стерилизация осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120-150°C в течение периода времени от 30 до 90 мин;

iii) получение алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся D_{50} в пределах от 3,0 до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем этот способ лишен стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и удаления супернатанта.

Механизм адьювантности соединений алюминия включает образование депо, эффективное поглощение антигенных частиц, адсорбированных на алюминии, антиген-презентующими клетками вследствие природы частиц и оптимального размера (<10 мкм) и стимуляцию иммунокомпетентных клеток организма посредством активации комплемента.

В еще одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ приготовления вакцины, который включает стадии:

i) добавление растворов подвергнутых стерилизации фильтрованием хлорида алюминия и тринатрийфосфата к предварительно стерилизованной воде для инъекций при перемешивании в течение 60 мин, предпочтительно от 35 до 55 мин, поддерживая рН образуемого осадка между 3,0 и 4,0, предпочтительно между 3,2 и 3,5;

ii) добавление антигенов к алюминийфосфатному гелю, полученному на стадии (i), незамедлительно без какой-либо очистки, стерилизации, определения размеров.

В еще одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусматривается применение алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии со способом адсорбции антигенов в вакцинных препаратах.

Преимущества настоящего изобретения

1. Способ настоящего изобретения не включает какое-либо добавление кислоты/щелочи для регулирования рН.
2. Способ не включает какую-либо стадию для уменьшения размера частиц алюминийфосфатного геля.
3. Способ не включает стадии осаждения и, таким образом, удаления супернатанта.
4. Способ не включает какую-либо стадию промывки.
5. Способ позволяет избежать высокотемпературных условий и более длительных периодов для образования.

Настоящее изобретение будет конкретнее проиллюстрировано со ссылкой на следующие примеры. Однако следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается этими примерами каким-либо образом, но включает его варианты в пределах параметров, описанных здесь, как это бывает хорошо известно специалистам в данной области техники.

Пример 1. Приготовление алюминийфосфатного геля.

Растворы хлорида алюминия и тринатрийфосфата в концентрации 485 ± 1 мМ использовали в качестве сырья, а воду для инъекций (WFI) в качестве растворителя для получения алюминийфосфатного геля. Оба раствора добавляли, как показано в табл. 1, с постоянной скоростью в течение 45 ± 10 мин к WFI (в объеме 3,1-3,15X объема раствора) при перемешивании при 550 ± 50 об/мин в сосуде, имеющем 2-4 перегородки, установленную сверху мешалку минимум с 3 лопастными колесами на разных высотах, каждое из которых имеет 4-лопасти. Добавление раствора хлорида алюминия начинали за 2-5 с до начала добавления раствора фосфата натрия для поддержания pH осаждения ниже 3,5 на протяжении всего процесса, за исключением последних 5-10% времени добавления, в течение которого наблюдалось повышение значения pH до приблизительно 5,0. После завершения добавления гель подвергали *in situ* стерилизации с использованием пара при $>121,1^\circ\text{C}$ в течение 30-45 мин. pH геля после стерилизации уменьшали на ~1 единицу, чтобы достичь приблизительно $4,0 \pm 0,3$.

Таблица 1

Приготовление алюминийфосфатного геля

Исходные растворы	Кол-во/л	Объемы растворов, требуемые для приготовления геля, объем		
		1,8 л	18 л	40 л
Хлорид алюминия (раствор 1)	117,1 г/л	350 мл	3,5 л	7,7 л
Тринатрийфосфат (раствор 2)	184,3 г/л	350 мл	3,5 л	7,7 л
WFI, требуемое кол-во		1,1 л	11 л	24,6 л
Конечная концентрация обеих солей в геле составляет 94,3 мМ; соотношение 1:1				

Алюминийфосфатный гель был получен в масштабе от 1 до 40 л с использованием вышеописанного способа, воспроизводимо дающего результаты в каждом масштабе при условии, что параметры находятся в заданном диапазоне. В этом способе нет другого осаждения, очистки, т.е. промывки геля с использованием каких-либо буферов для, например, физиологического раствора и т.п., и, следовательно, он является очень простым, прямым и приводит к получению геля, который готов для смешивания. Этот способ, таким образом, доказал свою универсальность, масштабируемость и экономическую эффективность, подтвердив тем самым его пригодность для коммерческого производства.

Пример 2. Размер частиц препарата алюминийфосфатного геля.

Определяли размер частиц алюминийфосфатного геля, приготовленного, как описано в примере 1, и было установлено, что средний размер частиц находится в области не более 7 мкм, при этом пределы для D_{10} , D_{50} и D_{90} составляют >1 мкм, 3-8 мкм и <14 мкм соответственно, без какой-либо дополнительной стадии обработки, например гомогенизации, отбора/удаления мелких частиц и т.д. Репрезентативные данные для значений pH и размеров частиц вместе со значениями PZC и дзета-потенциала, установленные во время приготовления партий геля, изготовленных в масштабе 18 и 40 л, как до, так и после стерилизации, приведены в табл. 2. Данные показывают, что без каких-либо дополнительных требований к способу этот способ доказал свою простоту и воспроизводимость.

Таблица 2

pH, пределы размеров частиц и другие параметры, проверенные на каждой из трех партий алюминийфосфатного геля (AlPhos Gel), приготовленного в масштабе 18 и 40 л

№ партии	18 л						40 л						
	APG 18/01		APG 18/02		APG 18/03		APG 40/01		APG 40/02		APG 40/03		
	BS	AS	BS	AS	BS	AS	BS	AS	BS	AS	BS	AS	
pH	5,2	4,3	5,2	4,1	4,8	3,9	4,9	4,0	5,1	4,2	4,9	3,8	
		1	3		8	1		6				2	
Размер частиц (мкм)	Среднее значение	3,64	4,7	3,5	5,6	3,6	4,1	4,2	4,8	3,4	4,6	3,6	4,3
	d ₁₀	2,07	3,1	2,0	2,6	2,0	2,7	2,7	3,2	2,0	3,1	2,2	2,6
			5	7	8	1	1	3	6	3	9	8	6
	d ₅₀	4,77	6,7	4,5	7,8	4,3	5,6	4,7	6,1	3,9	6,5	4,0	5,2
			1	4	5	2	4	3	2	4	7	8	
d ₉₀	8,26	10,9	7,7	12,7	8,8	9,8	7,3	10,0	6,7	10,2	6,5	8,8	
			9	7	9	8	3	0	5	2	4	3	
PZC	5,19	5,4	5,2	5,3	5,4	5,4	5,1	5,1	5,2	5,3	5,2	5,3	
			3	9	8	4		8	7	5	7	4	
Дзета-потенциал @ pH 7,5	-31,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		35,7	31,8	32,0	26,5	28,8	33,5	35,0	31,9	32,4	30,8	32,3	

BS=до стерилизации; AS=после стерилизации.

Пример 3. Представление адьюванта в виде алюминийфосфатного геля в иммуногенных композициях.

Алюминийфосфатный гель, приготовленный, как описано в примере 1, использовали в препарате жидкой пятивалентной вакцины (LPV), содержащей дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (TT), цельноклеточный коклюшный антиген (wP), поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и конъюгат полирибозил-рибитол-фосфата *Haemophilus influenzae* типа b с TT (Hib) в качестве антигенных компонентов, в физиологическом растворе в качестве конечного разбавителя. В этом препарате к гелю, полученному как в примере 1, при перемешивании при 200-300 об/мин добавляли один за другим антигены HBsAg, DT и TT без необходимости какого-либо регулирования pH, так как это идеальный pH для их адсорбции на геле (адьюванте), согласно литературе и как доказано в исследованиях заявителей. Затем эту смесь дополняли до 80% физиологическим раствором, необходимым для конечного объемного состава, с последующим добавлением wP; затем всю смесь охлаждали до температуры ниже 10°C и добавляли компонент Hib при перемешивании. Затем конечный объем доводили до требуемого уровня физиологическим раствором. Затем pH смеси, если требуется, регулировали так, чтобы он составлял от 6,2 до 6,5, но в большинстве случаев не было установлено, что это необходимо.

Описанный выше способ был оптимизирован для способа смешивания LPV, используя алюминийфосфатный гель, приготовленный, как описано в примере 1, в разных масштабах. С помощью этого способа были изготовлены смеси LPV объемом от 100 мл до 60 л, и все они были проверены и, как было доказано, соответствуют спецификациям для вакцины, включая параметры безопасности и активности каждого антигена, используемого в препарате.

Было также показано, что алюминийфосфатный гель подходит для приготовления жидкой четырехвалентной вакцины (LQV), содержащей дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (TT), цельноклеточный коклюшный антиген (wP) и конъюгат полирибозил-рибитол-фосфата *Haemophilus influenzae* типа b с TT (Hib) в качестве антигенных компонентов, в физиологическом растворе в качестве конечного разбавителя. В препарате этой вакцины прослеживаются те же антигены и следуют тем последовательностям их добавления, за исключением того, что не используется HBsAg, который первым добавляют в препарате LPV.

Смеси LPV объемом от 100 мл до 60 л были приготовлены с использованием этого способа, и все они были проверены и, как было доказано, соответствуют спецификациям для вакцины, включая параметры безопасности и активности каждого антигена, используемого в препарате.

Пример 4. Процедура и результаты способности к адсорбции антигенов.

Среди антигенов, используемых для приготовления LPV, HBsAg, DT и TT были тремя, которые связываются с алюминийфосфатным гелем. Собственное требование для связывания в LPV для HBsAg составляло >90%, для DT - >28%, а для TT оно составляло >30%. Алюминийфосфатный гель, полученный в разных масштабах, постоянно соответствовал этим требованиям при проверке в случае производства партии геля до 40 л и объема смеси LPV до 60 л. Вариации значений % адсорбции между обеими смесями LPV, полученными с использованием алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии с описанной в примере 1 процедурой, изготовленного в разных масштабах, являются незначительными. Кроме того, подвергание вакцины воздействию напряженных состояний (37°C в течение 14 дней) не меняло значительно значения % адсорбции. Репрезентативный пример этого свойства геля, изготовленного в разных масштабах (1 и 18 л) и используемого для смеси LPV в масштабах 2 и 60 л, вместе с 2- и 60-л смесями LPV, полученными с использованием Adju-Phos® от Brenntag Biosector (коммерческий поставщик), приведен в табл. 3.

В качестве примера доказательства стабильности смеси гель/LPV, полученной с использованием алюминийфосфатного геля, полученного в соответствии с примером 1, результаты в виде % адсорбции для трех антигенов 4-л смеси LPV, полученной и проверенной в дни 0 (выпуска готового продукта), после инкубации при 37°C в дни 5, 7 и 14 суммированы в табл. 4.

Таблица 3

Результаты в виде % адсорбции, в случае смесей LPV с использованием различных источников гелей и размеров смесей

Номер по порядку	Антиген	Adju-Phos® (Brenntag)		При приготовлении в соответствии с процедурой, описанной в примере 1.	
		2 л LPV	60 л LPV	2 л LPV	60 л LPV
1	HBsAg	94,8	99,7	98,8	98,9
2	Дифтерийный анатоксин	47,6	59,6	50,0	58,3
3	Столбнячный анатоксин	41,7	46,7	44,8	46,7

Данные, представленные в табл. 3, подтверждают, что % адсорбции алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии с описанной в примере 1 процедурой, соответствует таковому для Adju-Phos от Brenntag.

Таблица 4

Результаты в виде % адсорбции - 4 л смеси LPV в момент выпуска готовой продукции (день 0) и после инкубации при 37°C в течение 14 дней

День отбора образца	Дифтерийный анатоксин	Столбнячный анатоксин	HBsAg
День 0	50,0	40,72	96,5
День 5	77,1	53,8	98,7
День 7	41,7	48,6	99,2
День 14	56,8	47,5	98,9

Пример 5. Другие процедуры для характеристики геля и их результаты.

Несколько партий алюминийфосфатного геля, полученного, как описано в примере 1, были проанализированы на различные физико-химические свойства, чтобы они были полностью охарактеризованы. Кроме pH, размера частиц и содержания алюминия, было также проверено несколько более параметров, которые, наряду с причинами их анализа, суммированы в табл. 5.

Таблица 5

Проверяемые физико-химические свойства AlPhos геля и основная причина

Параметр		Предел	Влияние/причина анализа
Внешний вид		Белая мутная суспензия, в которой минеральный носитель имеет тенденцию к медленному оседанию	Описывает общий физический вид
Содержание алюминия		Не менее 2 мг/мл	Определяет связывание
Размер частиц (мкм)	Среднее значение	Не более 7	Определяет площадь поверхности, возможность агрегации, связывающую способность
	D ₁₀	≥1	
	D ₅₀	3-8	
	D ₉₀	≤14	
PZC (pI)		5,1±0,5	
Дзета-потенциал (@pH 7,5)		От -28 до -40 мВ	Определяет коэффициент/скорости адсорбции; основной фактор, определяющий агрегацию, также определяет
Способность к адсорбции антигенов		rHBsAg: ≥90% DN: ≥28% TT: ≥30%	Определяет относительное распределение антигенов в фазах раствор/гель
Профиль распределения	Свободный алюминий	Не более 50 ч./мл.	Определяет степень чистоты геля
концентрации и примеси	Растворимые фосфаты	Не более 0,5% в виде PO ₄	
Удельный вес		1,00-1,03	Определяет вес/единицу
Скорость осаждения		Не более 35%	Определяет осаждаемость геля
Осмотическое давление		550±50 мосмоль/кг	Отражает концентрацию растворенных веществ в геле

Репрезентативные количественные данные от шести партий алюминийфосфатного геля, полученных в масштабе 18 л, приготовленных в соответствии с описанной в примере 1 процедурой, для партий

валидации способа - партий LPV и LQV, приведены в табл. 6 и 7. Все эти партии соответствовали требованиям для всех параметров, проверенных на обеих стадиях после и до стерилизации; в то время как все партии соответствовали спецификациям для внешнего вида, стерильности и уровней примесей, количественные параметры среди них были проанализированы в этих таблицах.

Таблица 6

Анализ результатов физико-химических параметров.
Проверка алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии
с описанной в примере 1 процедурой - стадия до стерилизации

Номер по порядку	Тест		В партиях LPV			В партиях LQV			Анализ		
			LPV -1	LPV -2	LPV -3	LQV -A	LQV -B	LQV -C	Среднее значение	Стандартное отклонение	% CV
1	Размер частиц (мкм)	Среднее значение	3,50	3,19	3,24	3,50	3,62	3,73	3,46	0,21	6,10
		D ₁₀	2,03	1,86	1,93	1,97	2,12	2,26	2,03	0,14	7,09
		D ₅₀	4,27	3,67	3,68	4,4	4,19	4,29	4,07	0,32	7,77
		D ₉₀	7,34	6,43	6,28	7,82	7,26	7,19	7,05	0,59	8,31
2	РЗС		5,33	5,44	5,41	5,49	5,50	5,36	5,3	5,43	0,06
3	Дзета-потенциал (@ pH 7,5)		-	-	-	-	-	-	-	-	1,5
			32,8	32,6	31,8	33,4	30,7	33,7	32,3	32,3	
4	Скорость осаждения @ 48 часов (в %)		27	25	25	25	25	25	25	25,0	0,0

Значения CV (коэффициента вариации) для всех проверенных параметров, без учета индивидуальных пределов распределения размеров частиц, находились в пределах 10% и даже более в случае стадии после стерилизации; это свидетельствовало о большом постоянстве процедуры приготовления геля в пределах шести проанализированных партий, изготовленных в течение 6 месяцев с использованием различных партий исходных материалов. Данные также подтвердили, что только минорные, незначительные изменения в физико-химических параметрах геля происходят после стерилизации.

Таблица 7

Анализ результатов физико-химических параметров.
 Проверка алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии
 с описанной в примере 1 процедурой - стадия после стерилизации

Номер по порядку	Тест		В партиях LPV			В партиях LQV			Анализы		
			LPV-1	LPV-2	LPV-3	LQV-A	LQV-B	LQV-C	Среднее значение	Стандартное отклонение	% CV
1	Содержание алюминия		2,42	2,42	2,395	2,05	2,15	2,10	2,26	0,17	7,71
2	pH		3,77	4,28	4,31	3,91	4,04	4,21	4,09	0,22	5,32
3	Размер частиц (мкм)	Среднее значение	4,13	3,91	4,00	4,24	3,90	4,00	4,03	0,13	3,28
		D ₁₀	2,49	2,57	2,39	2,52	2,46	2,38	2,44	0,07	3,00
		D ₅₀	5,48	4,07	4,97	5,73	5,15	4,68	5,01	0,59	11,81
		D ₉₀	9,29	7,63	8,45	9,63	8,51	7,85	8,56	0,78	9,14
4	PZC		5,33	5,48	5,54	5,47	5,44	5,4	5,44	0,07	1,33
5	Дзета-потенциал (@ pH 7,5)		-32,8	-31,27	-33,43	-33,9	-33,03	-34,17	-33,77	0,60	1,77
6	Удельный вес		1,020	1,020	1,019	Не проверено			Не применимо		
7	Осмотическое давление		528	542	507	Не проверено			Не применимо		
8	Скорость осаждения @ 48 часов (в %)		27	28	28	28	27	28	27,7	0,52	1,87

Некоторые из этих параметров для нескольких партий проверялись на протяжении периода хранения геля (до 7 дней) на разных стадиях, а именно: после приготовления, после *in situ* стерилизации и после автоклавирования *in situ* стерилизованного геля. Репрезентативные данные от одной партии, проведенной в отношении эффекта хранения на различные параметры, суммированы в табл. 8. Данные подтверждают, что параметры не изменяются значительно до 7 дней после стерилизации/автоклавирования. Эти характеристики и их анализ подтверждают единообразие гелей, полученных в разных масштабах, а также подтверждают надежность способа приготовления геля.

Физико-химические параметры партии алюминийфосфатного геля на различных стадиях приготовления и хранения

Стадия	Размер частиц (мкм)				Среднее значение	рН	PZC	Дзета	Осмотическое давление МОСМОЛЬ / кг	Скорость осаднения @ 48 ч (в %)
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀							
После приготовления	2,2	4,7	8,38	3,7	5,5	5,	-	518	25	
	1	3		9	1	2	32,87			
После in-situ стерилизации	2,9	5,6	9,30	4,4	4,2	5,	-	Не проверено	28	
	0	0		4	0	0	31,93			
После автоклавирования in-situ стерилизованного геля (День 0)	2,9	5,7	9,73	4,5	4,2	5,	-		28	
	9	9		2	0	0	32,10			
После автоклавирования in-situ стерилизованного геля (День 7)	2,9	5,7	10,0	4,5	4,6	5,	-	28		
	4	9	4	4	5	0	34,67			
После автоклавирования только	День 0	2,19	4,74	8,45	3,78	4,30	5,1	-	523	26
	День 7	2,33	4,92	9,19	3,94	4,68	5,2	-	524	25

Пример 6. Эффективность и стабильность AlPhos геля в качестве адьюванта в вакцинных препаратах.

Три партии 60 л LPV были приготовлены с использованием трех различных партий алюминийфосфатного геля, приготовленного, как описано в примере 1, и одна 60-л партия LPV была приготовлена с использованием Adju-Phos геля от Brenntag в качестве "контроля" - для сравнения продукта, полученного с использованием описанной в примере 1 процедуры, и AlPhos гелей от Brenntag. Алюминийфосфатный гель был приготовлен в масштабе 18 л с использованием стерилизованных растворов и в стерильном сосуде и перенесен в стерильные стеклянные бутылки для стерилизации автоклавированием; этот стерильный гель был перенесен в сосуд для смешивания для смеси LPV.

Три конечных балка LPV были получены с использованием алюминийфосфатного геля собственного производства со следующими номерами партий (как указано в табл. 6 и 7 в примере 5): LPV-1, LPV-2 и LPV-3. "Контрольной" партии конечного балка LPV, полученного с использованием Adju-Phos от Brenntag, присвоен номер "LPV-4".

Множество антигенов, используемых для приготовления LPV-1 и LPV-4, было одинаковым, чтобы можно было сравнить влияние геля, полученного в соответствии с настоящим изобретением, и влияние Adju-Phos, имеющегося в продаже, изготовленного Brenntag Biosector.

Результаты всех качественных и количественных тестов соответствовали критериям приемлемости для соответствующего параметра и, таким образом, подтверждают, что AlPhos гель, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением, создавал партии LPV, которые были очень сопоставимы с партиями, полученными с использованием Adju-Phos от Brenntag, тем самым подтверждая пригодность AlPhos геля собственного производства при изготовлении вакцинных препаратов.

Подобно LPV, три конечных балка LQV (вакцины D-T-P-Hib) были также получены с использованием алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии с настоящим изобретением, со следующими номерами партий (как указано в табл. 6 и 7 в примере 5): LQV-A, LQV-B и LQV-C. Результаты всех качественных и количественных тестов соответствовали критериям приемлемости (таким же, как для LPV) для соответствующего параметра, тем самым подтверждая, что гель, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением для смешивания партий LQV, также был очень единообразным. Эти данные вновь подтверждают пригодность AlPhos геля настоящего изобретения при изготовлении вакцинных препаратов.

Все партии LPV и LQV, полученные, как указано выше, загружали в стеклянные флаконы в виде 10 однократных доз (0,5 мл) (всего 5,0 мл) и подвергали исследованиям стабильности в режиме реального

времени (2-8°C) и в условиях ускоренных испытаний в виде хранения при температурах (25±2°C). Все параметры тестов, которые были оценены для проверки стабильности, соответствовали спецификациям до 3 месяцев хранения, при последней проверке, в обоих условиях для обеих вакцин; и результаты параметров стабильности, проверенных на загруженных конечных партиях LPV-1 и LPV-4 до составляющего 9 месяцев момента времени при сохранении в условиях хранения в режиме реального времени, снова являются сопоставимыми, что указывает на отсутствие изменения какого-либо из проверенных параметров из-за смены источника AlPhos геля.

Следовательно, доказано, что способ настоящего изобретения для приготовления алюминийфосфатного геля с использованием уникального процесса является легко воспроизводимым, масштабируемым и очень подходящим для применения в вакцинных препаратах в качестве адьюванта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения алюминийфосфатного геля, который включает:

i) добавление растворов хлорида алюминия и трехосновного фосфата натрия к воде в постоянном соотношении при перемешивании, поддерживая рН от 3,0 до 4,0, без добавления какой-либо другой кислоты или щелочи для регулировки рН, с получением осадка фосфата алюминия;

ii) стерилизацию осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120-150°C в течение периода времени от 30 до 90 мин;

с получением алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся D_{50} в пределах от 3,0 до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем способ выполняют без стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и удаления супернатанта.

2. Способ по п.1, в котором используемые концентрации растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата находятся в диапазоне от 400 до 500 миллимоль (мМ).

3. Способ по п.1, в котором используемые концентрации растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата составляют от 480 до 490 мМ.

4. Способ по п.1, в котором добавление растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата выполняют при перемешивании со скоростью не менее 400 об/мин.

5. Способ по п.4, в котором добавление растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата выполняют при перемешивании со скоростью от 500 до 600 об/мин.

6. Способ по п.1, в котором добавление на стадии (i) выполняют при комнатной температуре.

7. Способ по п.1, в котором добавление на стадии (i) выполняют в течение периода от 10 до 60 мин, предпочтительно от 35 до 55 мин.

8. Способ по п.1, который выполняют в замкнутой системе.

9. Способ по п.1, который выполняют в диапазоне рН от 3,2 до 3,5 без добавления какой-либо другой кислоты или щелочи.

10. Способ получения алюминийфосфатного геля, который включает стадии:

i) добавление растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата к воде для инъекций при перемешивании в течение 60 мин, поддерживая рН образуемого осадка от 3,0 до 4,0, без добавления какой-либо другой кислоты или щелочи для регулировки рН;

ii) стерилизация осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120-150°C в течение периода времени от 30 до 90 мин;

с получением алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся D_{50} в пределах от 3,0 до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем способ выполняют без стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и удаления супернатанта.

11. Способ по п.10, в котором добавление на стадии i) осуществляют при перемешивании в течение от 35 до 55 мин.

12. Способ по п.10, в котором рН на стадии i) поддерживают от 3,2 до 3,5.

